

# 棉花 45S rDNA 内转录间隔区的克隆与分析

刘玉玲<sup>1</sup>, 翟靖靖<sup>1,2</sup>, 李依<sup>1</sup>, 李兴燕<sup>1</sup>, 赵梓霖<sup>1</sup>, 张圣文<sup>1</sup>, 韦洋洋<sup>1</sup>, 彭仁海<sup>1,2</sup>

(1. 安阳工学院 生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000; 2. 郑州大学 生命科学学院, 郑州 450001)

**摘要:** 45S rDNA 的内转录间隔区(Internal transcribed space, ITS)序列变异性强, 是被广泛应用于物种间进化关系研究的序列标签。通过克隆艾克棉(*Gossypium ekmanianum*, AD<sub>6</sub>)、斯蒂芬斯棉(*Gossypium stephensii*, AD<sub>7</sub>)、异常棉(*Gossypium anomalum*, B<sub>1</sub>)、戴维逊氏棉(*Gossypium davidsonii*, D<sub>3-d</sub>)、克劳茨基棉(*Gossypium klotzschianum*, D<sub>3-k</sub>)、旱地棉(*Gossypium aridum*, D<sub>4</sub>) 6 个棉种的 ITS 序列, 首次获得新鉴定的 2 个四倍体棉种艾克棉和斯蒂芬斯棉的 ITS 区序列信息, 补充了异常棉、克劳茨基棉和戴维逊氏棉 3 个棉种 ITS 区序列的未知碱基。基于 ITS 序列信息构建了涵盖 A, B, C, D, E, F, AD 7 个基因组的棉属系统发育树, 确定了新鉴定的 2 个四倍体棉种进化地位, 探讨了棉属亲缘关系, 研究结果补充和完善了棉属 ITS 序列信息, 进一步明确了棉属间的进化关系, 为棉属亲缘关系分析提供参考。

**关键词:** 棉属; ITS; 45S rDNA; 进化分析

**中图分类号:** Q756

**文献标志码:** A

棉属(*Gossypium*)属于锦葵科(Malvaceae)棉族(*Gossypieae*), 包括 8 个二倍体基因组(A-G 和 K)和 1 个由 A 和 D 基因组祖先种杂交后加倍形成的异源四倍体基因组(AD)<sup>[1]</sup>。棉属大约有 50 多个种, 基因组多样性较高, 是植物分类、系统发育、基因组进化研究的重要物种<sup>[2]</sup>, 棉属的进化关系、异源四倍体棉种的供体种研究倍受重视。早期研究者根据染色体大小和种间杂交的染色体行为对棉属的不同基因组进行界定<sup>[3-5]</sup>。近年来, 基于更多的形态、生理、分子生物学证据, 不断有新种被挖掘和定名<sup>[6-9]</sup>, 棉属的分类体系也不断完善。

真核生物中, 核糖体 DNA 基因(ribosomal DNA, rDNA)包括 5S rDNA 和 45S rDNA。其中 45S rDNA 是由 18S rDNA, 5.8S rDNA 和 28S rDNA 串联排列组成的重复单元, 通过内转录间隔区(Internal transcribed space, ITS)和基因间隔区(Intergenic spacer, IGS)连接。ITS 是由 ITS1, ITS2 和高度保守的 5.8S rDNA 外显子共同组成的区域, 其中 ITS1 和 ITS2 分别处在 5.8S rDNA 左右两侧, 嵌入在 18S 和 28S 之间<sup>[10]</sup>。相对于保守性很高的核糖体 DNA 基因编码区, ITS 区进化速度快, 序列变异丰富, 已经成为种属关系鉴别的重要分子标记。最早 PORTER 和 COLLINS 基于 ITS 序列对蚊属姊妹种 *Anopheles freeborni* 和 *Anopheles hermsi* 进行了种间差异的鉴别<sup>[11]</sup>。之后, 利用 ITS 进行种群分化或系统发生物地理学等方面的研究逐渐增加, 涉及真菌<sup>[12]</sup>、藻类<sup>[13]</sup>、动物<sup>[14]</sup>、植物<sup>[15-16]</sup>等。在物种属间、种间、甚至种内关系研究中发挥了重要作用。

不同研究者依据不同的研究方法对棉属的进化关系提出了不同的见解。WENDEL 和 ALBERT 根据叶绿体 DNA(cpDNA)限制性位点数据, 提出澳洲棉谱系(C, G 和 K 基因组)是棉属中最早分化出来的<sup>[17]</sup>。后来基于核糖体内部转录间隔区(nrITS)的序列数据分析, 认为 E 基因组和 C 基因组是姐妹类群<sup>[18-19]</sup>。通过对 NCBI 收录的棉属 ITS 序列进行分析, 发现部分棉种的 ITS 序列存在大量的未知碱基; 同时, 由于近年来新

收稿日期:2022-09-29; 修回日期:2022-11-25.

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0100300); 中原科技创新领军人才(214200510029); 河南省教育科学“十四五”规划一般课题(2021YB0283).

作者简介:刘玉玲(1972-), 女, 河南长垣人, 安阳工学院副教授, 博士, 研究方向为细胞遗传学, E-mail:liuyuy2012@163.com.

通信作者:彭仁海, E-mail:aydxprh@163.com.

种的鉴定<sup>[6-9]</sup>,棉种的 ITS 序列信息有待进一步完善.本研究利用真核生物 ITS 序列通用引物,对候选棉种的 ITS 序列进行克隆分析并构建候选棉种的系统进化树,为棉属的进化与亲缘关系提供科学依据与参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用的材料由中国农业科学院棉花研究所野生棉课题组提供,包括棉属的 6 个棉种:艾克棉(*Gossypium ekmanianum*, AD<sub>6</sub>)、斯蒂芬斯棉(*Gossypium stephensii*, AD<sub>7</sub>)、异常棉(*Gossypium anomalum*, B<sub>1</sub>)、戴维逊氏棉(*Gossypium davidsonii*, D<sub>3-d</sub>)、克劳茨基棉(*Gossypium klotzschianum*, D<sub>3-k</sub>)、旱地棉(*Gossypium aridum*, D<sub>4</sub>);其他 14 个棉种及 1 个棉属的近缘属克氏拟似棉的 ITS 序列从 NCBI 数据库下载,具体信息见附表 I. ITS 通用引物是根据 18S 和 28S 序列的保守性设计的<sup>[19]</sup>,由上海生工生物公司合成.引物信息为:F/5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3',R/5'-TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'.

### 1.2 棉花 DNA 提取,ITS 序列的 PCR 扩增、回收

用 EZUP 柱式植物基因组 DNA 提取试剂盒(生工生物)提取基因组 DNA,经超微量分光光度计 Nano-Drop2000 检测浓度,质量分数为 1%琼脂糖凝胶电泳检,-20℃保存备用.以候选棉种基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增体系为 50 μL,其中包括 2×Taq Master Mix 25 μL,10 μmol 的正向和反向引物各 0.8 μL,模板 DNA 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 22.4 μL.扩增条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,循环 30 次,最后 72℃ 10 min.质量分数为 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段长度,选择背景清晰,亮度适合的条带,使用 HiPure Gel Pure DNA Micro Kit(D2110-024)(Magen)回收 ITS 扩增片段.

### 1.3 目的片段的克隆及测序

回收产物用 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit(TransGen Biotech)连接,转化到 50 μL 大肠杆菌 Trans1-T1 菌株感受态细胞,涂布于含有卡那霉素的 LB 培养基培养过夜,以 ITS 引物对生长菌落进行菌落 PCR 鉴定,确定阳性克隆.每个棉种随机挑选 5 个阳性克隆送至上海生工生物公司测序.

### 1.4 系统发育分析

根据文献测得序列用 DNAMAN 反复比对后去除两端 18S 和 26S 的区域以及部分引物区删除,获得候选棉种的 ITS 区(ITS1,5.8S,ITS2)序列信息<sup>[20]</sup>.用克氏拟似棉属的克氏拟似棉(*Gossypioides kirkii*)ITS 序列作外类群,加上 NCBI 数据库选择的棉属不同基因组的 14 个代表棉种的 ITS 序列,用 MEGA-X 软件中的 Alignment 程序中的 Clustal W 对所有序列进行多重对位排列(Multiple alignments),用 MEGA-X 软件包进行系统发育分析和进化树的构建,用 Maximum Composite Likelihood 模型计算遗传距离,所有对位排列结果中的空位(gaps)或缺失数据(Missing data)作成对删除(Pairwise deletion)处理,进化距离分析采用邻位相连法(NJ,Neighbor-joining).系统树的每个分支的统计学显著性分析以 Bootstrap 进行检验,重复次数为 1 000.

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组 DNA 质量检测结果

提取得到艾克棉、斯蒂芬斯棉、异常棉、戴维逊氏棉、克劳茨基棉和旱地棉的基因组 DNA,通过 Nano-Drop2000 进行了浓度检测,质量浓度都在 200 mg/L 以上,A260/280 也符合要求.通过琼脂糖凝胶电泳进行长度检测,电泳条带清晰,没有降解,能够满足后续实验的需要(附图 1(a)).

### 2.2 ITS 序列扩增、回收与测序

采用通用引物 ITS(F+R)以 6 种候选棉种 DNA 为模板扩增目的片段,得到范围在 750~1 000 bp 之间的 PCR 产物.分别切胶回收,胶回收的片段结果见附图 I (b),与预期片段大小相符合.菌落 PCR 检测结果见附图 I (c)所示,大部分克隆为阳性,挑选部分片段长度与胶回收产物长度一致的阳性克隆,送上海生工生物有限公司测序.部分棉种测得的克隆序列长度为 799~800 bp,符合 PCR 产物的片段长度,其中包括引物设计过程中涉及的部分 18S rDNA 和 28S rDNA 序列,以及 ITS1,ITS2 和 5.8S rDNA 的序列.

### 2.3 ITS 序列组成

根据报道<sup>[20]</sup>,阳性克隆的测序序列去除 18S rDNA 的 3'端和 26S rDNA 的 5'端区域的碱基序列,保留 ITS 区域,即 ITS1-5.8S-ITS2 区域.结果显示 6 个候选棉种的 ITS 区序列长度除了异常棉 683 bp 外,其他皆为 682 bp(表 1),长度符合被子植物 ITS 区 500~750 bp 的特征.序列比对表明,艾克棉和斯蒂芬斯棉序列一致(图 1),其他棉种间表现出明显的碱基变异.

表 1 候选棉种 ITS 区段的长度和碱基含量

Tab. 1 Length and base content of ITS sequences of candidate cotton

棉种	片段长度/bp	A 碱基含量/%	C 碱基含量/%	G 碱基含量/%	T 碱基含量/%
艾克棉 AD <sub>6</sub>	682	20.7	31.1	28.6	19.6
斯蒂芬斯棉 AD <sub>7</sub>	682	20.7	31.1	28.6	19.6
异常棉 B <sub>1</sub>	683	21.7	29.0	27.8	21.5
戴维逊氏棉 D <sub>3-d</sub>	682	20.8	30.1	28.6	20.5
克劳茨基棉 D <sub>3-k</sub>	682	21.1	30.8	28.2	19.9
旱地棉 D <sub>4</sub>	682	20.7	30.6	28.6	20.1

>ITS1-5.8S-ITS2

```
TCGAAAACCTGCCTAGCAGAACGCCCGCAAACGCGTTGCAAACAACACCGGAGGTGGTGCGGGT
GCATCCTCGCCTCTCGCCACCCCGTGCTCGGAGCGGCCAGTCTCGTCGTCCCTTTGCCCGTCGG
GTGGGGTGAGATGCCGGGATCAACCTCTTCGAGGCAAAGCGAACAAAACCCCGGCGCGAATCGCG
CCAAGGAATCGAAACGAAAGAAAGGGGCACGTCTTCTGTGCGCCGACCGTTCGCGGTGTGCATGCT
TCAGTGATGTTGTTCTCTGTGCGAAAATATA CAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGA
GTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCA
TCGTCGCCCCATCAACCATGAGCCCTCGAGCCTCGGTTGGACCGCGGGCGGAAATTGGCCTCCC
GTGCGCTCACAGCCAGCGGTTGGCCTAAATTCGAGTCCTCGACGACATCATCGTCGCGACGATCGG
TGTAATGCTGCAAGCAACCTCGTTCGGAGTCGTGCGCGTCCGTGATCGAGACCCCTGAACCCCTT
TCGCGATCGCAAGGACGGTGTCTCGCA
```

图1 艾克棉和斯蒂芬斯棉ITS1-5.8S-ITS2序列

Fig. 1 ITS1-5.8S-ITS2 sequence of *G. ekmanianum* and *G. stephensii*

NCBI 收录的棉种 ITS 序列中存在不同数量的未知碱基,本实验结果对序列信息进行了完善.如 NCBI 收录的异常棉 ITS 区序列(序列号 U56807)在 368~401 bp 为未知碱基,本测序结果显示该区域的碱基为 TATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC(图 2(a));克劳茨基棉(序列号 U12728)的 211 bp, 214 bp 和 216 bp 位置处分别存在一个未知碱基 N,本测序结果在相对应的碱基分别是 G, A, G 碱基(图 2(b));戴维逊氏棉(序列号 U12729)的第 211 bp, 214 bp 位置分别存在一个未知碱基 N,本测序结果在相对应的碱基分别是 G, A(图 2(c)).

### 2.4 棉属 ITS 序列比较和系统发育分析

克隆得到的 6 个棉种的 ITS 区(ITS1, 5.8S, ITS2)序列与 NCBI 下载的 14 个棉种的 ITS 序列一起,以棉属近缘属克氏拟似棉的 ITS 序列作为外族,利用 MEGA-X 软件构建了涵盖棉属 A, B, C, D, E, F 和 AD 共 7 个基因组的 NJ 系统发育树(图 3).结果显示,AD 基因组的艾克棉(AD<sub>6</sub>)和斯蒂芬斯棉(AD<sub>7</sub>)和陆地棉(AD<sub>1</sub>)处于同一个小分支,三者的亲缘关系较近,支持率达到了 61%;海岛棉(AD<sub>2</sub>)与达尔文氏棉(AD<sub>5</sub>)形成独立小分支,亲缘关系较近,支持率 87%;D 基因组中雷蒙德氏棉(D<sub>5</sub>)与异源四倍体陆地棉(AD<sub>1</sub>)、海岛棉(AD<sub>2</sub>)、达尔文氏棉(AD<sub>5</sub>)、艾克棉(AD<sub>6</sub>)和斯蒂芬斯棉(AD<sub>7</sub>)距离最近,支持率达到 75%;C 基因组的斯特提棉(C<sub>1</sub>)与 E 基因组的司笃克氏棉(E<sub>1</sub>)在一个小分支,支持率为 77%;D 基因组的拟似棉(D<sub>6</sub>)与 D 基因组的其他棉种距离较远,更接近 A, B, F 基因组棉种且支持率为 99%;AD 基因组的黄褐棉(AD<sub>4</sub>)与异源四倍体中其他棉种的距离较远,与 D 基因组的拟似棉(D<sub>6</sub>)在一个分支,支持率 99%,拟似棉有可能是四倍体黄褐棉的 D 亚组供体种.

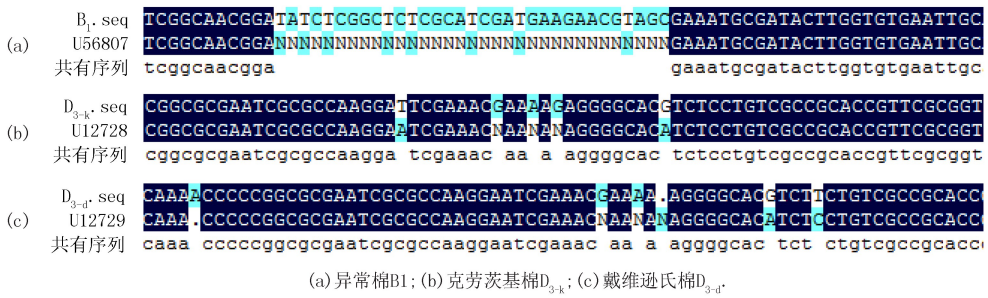
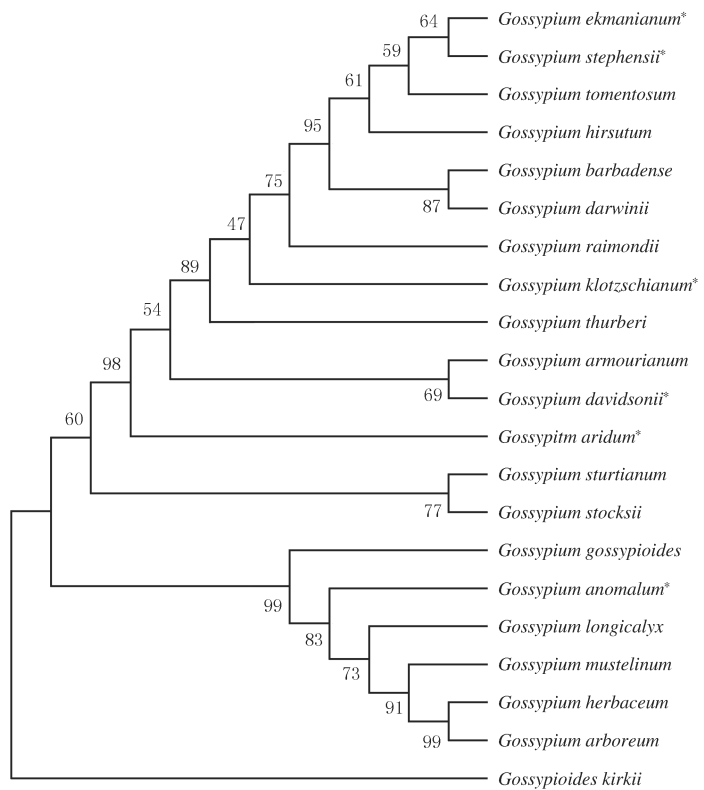


图2 NCBI收录的部分棉种ITS序列未知碱基鉴定

Fig.2 Identification of unknown bases in ITS sequences of some cotton species included in NCBI

### 3 讨 论

棉属的起源进化关系,尤其是异源四倍体棉种的供体种来源一直是棉花生物学基础研究的关注点.关于 A 和 D 基因组中的哪些种是 AD 基因组的供体种,一直存在单系起源说<sup>[21]</sup>和多系起源说<sup>[22]</sup>.本研究中基于 ITS 序列构建的进化树显示了 7 个四倍体棉种与 D 基因组不同棉种的亲缘关系,比较明显的是雷蒙德氏棉(D<sub>5</sub>)与陆地棉(AD<sub>1</sub>)、海岛棉(AD<sub>2</sub>)、达尔文氏棉(AD<sub>5</sub>)、艾克棉(AD<sub>6</sub>)和斯蒂芬斯棉(AD<sub>7</sub>)距离较近,处于一个大的分支,推测雷蒙德氏棉(D<sub>5</sub>)可能是上述四倍体棉种的供体种.进化分析显示黄褐棉(AD<sub>4</sub>)与其他四倍体棉种距离较远,支持了前人研究中关于黄褐棉是 AD 谱系中最早分支的唯一后代的观点<sup>[23]</sup>.WU 等<sup>[24]</sup>通过 45S rDNA 染色体定位分析,发现黄褐棉的 3 对 45S rDNA 位点全部分布在 A 亚基因组染色体上,而其他异源多倍体棉种的 45S rDNA 位点 1 对位于 A 亚基因组,2 对位于 D 亚基因组,在以雷蒙德氏棉作为可能供体种的前提下上推测黄褐棉可能存在四倍体化过程中经历了 45S rDNA 位点的丢失,即供体种 D 基因组 45S rDNA 位点的丢失,或者存在更复杂的动态进化.拟似棉也是已经完成 FISH 验证的 9 个 D 基因组棉种中唯一一个 45S rDNA 位点数为 2 对的棉种,少于其他同基因组棉种,就重复 DNA 而言,拟似棉与不同于其他 D 基因组棉种,而更近似于 A 基因组棉种<sup>[25]</sup>.本研究中,D 基因组的拟似棉与黄褐棉、A,B 和 F 基因组在一个大分支,结合前人研究成果中两个棉种在各自基因组内的特殊性,推测黄褐棉的 D 亚组供体种可能为拟似棉,进一步支持了多系起源的观点.



\*为本研究克隆的序列,其它为NCBI下载序列.

图3 候选棉种ITS序列与棉属部分棉种ITS序列NJ系统发育树

Fig.3 The NJ phylogenetic tree of cotton based on ITS sequences

A 基因组中草棉(A<sub>1</sub>)和亚洲棉(A<sub>2</sub>)与异源四倍体棉种的距离较远,进一步支持了比草棉和亚洲棉更早

的阿非利加棉( $A_{1a}$ )或者灭绝的  $A_0$  作为四倍体棉种 A 亚组供体种的推论<sup>[26]</sup>.达尔文氏棉与海岛棉在一个小分支,四倍体棉种中黄褐棉与陆地棉距离最远.C 基因组的斯特提棉与 E 基因组的司笃克氏棉在一个小分支,被认为是姐妹类群<sup>[19]</sup>.

艾克棉( $AD_6$ )和斯蒂芬斯棉( $AD_7$ )是近年基于更多的形态、生理、分子生物学证据,被鉴定的新种.之前的 5 个四倍体棉种中,毛棉主要分布于夏威夷及太平洋的其他群岛,黄褐棉分布在巴西一块很小的区域内,它是遗传上距离陆地棉最远的一个棉种.达尔文氏棉是海岛棉的野生近缘种,主要分布在加拉帕戈斯群岛,黄褐棉是四倍化形成之后最早分离出来的一个分支,与陆地棉亲缘关系最远<sup>[20]</sup>.本研究进化树分析也支持了 WENDEL 等<sup>[21]</sup>关于四倍体棉种的进化关系:海岛棉与达尔文氏棉形成独立小分支,支持率 87%;黄褐棉独立于其他四倍体棉种之外.新种艾克棉和斯蒂芬斯棉与陆地棉聚到同一个分支,它们亲缘关系较近,也说明了在明确为新种之前被认为是陆地棉的野生种系的原因<sup>[7,9]</sup>.

## 4 结 论

利用 ITS 通用引物成功获得了 6 个棉种的 ITS 序列信息,基于序列比对分析,补充了前人相关研究中部分棉种 ITS 区序列的未知碱基,并首次完成新鉴定的两个四倍体棉种  $AD_6$  和  $AD_7$  的 ITS 区序列信息,从而修正和完善了棉属的 ITS 序列.在此基础上构建了涵盖了 A, B, C, D, E, F, AD 共 7 个基因组的棉属系统发育树.进化分析表明,新鉴定的两个四倍体棉种与陆地棉有着较近的亲缘关系;四倍体棉种的 D 亚组供体种有着不同来源,支持了多系起源的观点.

## 附 录

附表、图见电子版(DOI:10.16366/j.cnki.1000-2367.2023.01.018).

## 参 考 文 献

- [1] FRYXELL P A, CRAVEN L A, STEWART J M. A revision of *Gossypium* sect. *grandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species[J]. *Systematic Botany*, 1992, 17(1): 91-114.
- [2] WANG K B, WENDEL J F, HUA J P. Designations for individual genomes and chromosomes in *Gossypium* [J]. *Journal of Cotton Research*, 2018, 1(1): 1-5.
- [3] BEASLEY J O. Meiotic chromosome behavior in species, species hybrids, haploids, and induced polyploids of *Gossypium* [J]. *Genetics*, 1942, 27(1): 25-54.
- [4] PHILLIPS L L. The cytology and phylogenetics of the diploid species of *Gossypium* [J]. *American Journal of Botany*, 1966, 53(4): 328-335.
- [5] ENDRIZZI J E. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium* [J]. *Advances in Genetics*, 1985, 23: 271-375.
- [6] KRPOVICKAS A. *Gossypium ekmanianum* (Malvaceae), algodón silvestre de la república dominicana [J]. *Bonplandia*, 2008, 17(1): 55-63.
- [7] GROVER C E, ZHU X, GRUPP K K, et al. Molecular confirmation of species status for the allopolyploid cotton species, *Gossypium ekmanianum* Wittmack [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2015, 62(1): 103-114.
- [8] STEWART J M, CRAVEN L A, BRUBAKER C, et al. *Gossypium anapoides* (Malvaceae), a new species from western Australia [J]. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 2015, 23(4): 447-451.
- [9] GALLAGHER J P, GROVER C E, REX K, et al. A new species of cotton from wake atoll, *Gossypium stephensii* (Malvaceae) [J]. *Systematic Botany*, 2017, 42(1): 115-123.
- [10] POCZAI P, HYVÖNEN J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1897-1912.
- [11] PORTER C H, COLLINS F H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae) [J]. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1991, 45(2): 271-279.
- [12] STENROOS S. Phylogeny of the genus *Cladonia* s. lat. (Cladoniaceae, ascomycetes) inferred from molecular, morphological, and chemical data [J]. *Cladistics*, 2002, 18(3): 237-278.
- [13] VAN OPPEN M J, MIEOG J C, SÁNCHEZ C A, et al. Diversity of algal endosymbionts (zooxanthellae) in octocorals: the roles of geography and host relationships [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2403-2417.
- [14] PLEYTE K A. Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the First Internal Tran-

- scribed Spacer(ITS 1)of ribosomal DNA[J].Molecular Phylogenetics and Evolution,1992,1(3):223-230.
- [15] KOLOREN O,KOLOREN Z,EKER S.Molecular phylogeny of *Artemisia* species based on the internal transcribed spacer(ITS)of 18S-26S rDNA in Ordu Province of Turkey[J].Biotechnology & Biotechnological Equipment,2016,30(5):929-934.
- [16] CHEN S L,YAO H,HAN J P,et al.Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J].PLoS One,2010,5(1):e8613.
- [17] WENDEL J F,ALBERT V A.Phylogenetics of the cotton genus(*Gossypium*):character-state weighted parsimony analysis of chloroplast-DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications[J].Systematic Botany,1992,17(1):115-143.
- [18] CRONN R C,ZHAO X P,PATERSON A H,et al.Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family:5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons[J].Journal of Molecular Evolution,1996,42(6):685-705.
- [19] SEELANAN T,SCHNABEL A,WENDEL J F.Congruence and consensus in the cotton tribe(Malvaceae)[J].Systematic Botany,1997,22(2):259-290.
- [20] WENDEL J F,SCHNABEL A,SEELANAN T.Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*)[J].Advances in Therapy,1995,92(1):280-284.
- [21] WENDEL J F,CRONN R C.Polyploidy and the evolutionary history of cotton[M].Advances in Agronomy.Amsterdam:Elsevier,2003:139-186.
- [22] PARKS C R,EZELL W L,WILLIAMS D E,et al.The application of flavonoid distribution to taxonomic problems in the genus *Gossypium*[J].Bulletin of the Torrey Botanical Club,1975,102(6):350-361.
- [23] SMALL R L,RYBURN J A,CRONN R C,et al.The tortoise and the hare:choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group[J].American Journal of Botany,1998,85(9):1301-1315.
- [24] WU Q,LIU F,LI S,et al.Uniqueness of the *Gossypium mustelinum* genome revealed by GISH and 45S rDNA FISH[J].Journal of Integrative Plant Biology,2013,55(7):654-662.
- [25] 王坤波.棉属 21 个种基于原位杂交的核型分析[D].北京:中国农业科学院,2009.  
WANG K B.FISH based karyotype analysis of 21 *Gossypium* species[D].Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences,2009.
- [26] HUANG G,WU Z,PERCY R G,et al.Genome sequence of *Gossypium herbaceum* and genome updates of *Gossypium arboreum* and *Gossypium hirsutum* provide insights into cotton A-genome evolution[J].Nature Genetics,2020,52(5):516-524.

## Evolution analysis of cotton based on 45S rDNA internal transcribed spacer

Liu Yuling<sup>1</sup>, Zhai Jingjing<sup>1,2</sup>, Li Yi<sup>1</sup>, Li Xingyan<sup>1</sup>, Zhao Zilin<sup>1</sup>, Zhang Shengwen<sup>1</sup>, Wei Yangyang<sup>1</sup>, Peng Renhai<sup>1,2</sup>

(1. School of Biology and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, China;

2. School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

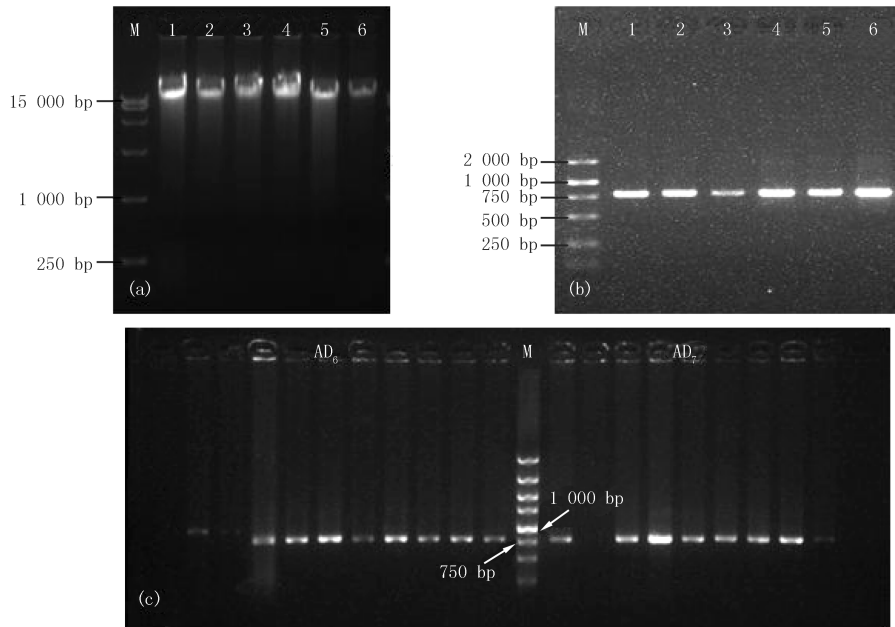
**Abstract:** The Internal transcribed space(ITS)sequence of 45S rDNA is highly variable and is a widely used as sequence barcode in the study of evolutionary relationships among species. In this study, the ITS sequences of 6 cotton species, *Gossypium ekmanianum*(AD<sub>6</sub>), *Gossypium stephensi*(AD<sub>7</sub>), *Gossypium anomalum*(B<sub>1</sub>), *Gossypium davidsonii*(D<sub>3-d</sub>), *Gossypium klotzschianum*(D<sub>3-k</sub>), *Gossypium aridum*(D<sub>1</sub>) were cloned. The ITS sequences of two newly identified tetraploid cotton species, *G. ekmanianum* and *G. stephensi*, were obtained for the first time, and the unknown bases of ITS sequences of *G. anomalum*, *G. davidsonii* and *G. klotzschianum* were added. A phylogenetic tree of *Gossypium* was constructed based on ITS sequence information, which covers A, B, C, D, E, F and AD 7 genomes of *Gossypium*. The evolutionary status of the two newly identified tetraploid cotton species was determined, and the genetic relationship of cotton was discussed. The results of this study supplemented and perfected ITS sequence information of cotton, and further clarified the evolutionary relationship between the cotton, which will provide reference for phylogenetic analysis of cotton.

**Keywords:** *Gossypium*; ITS; 45S rDNA; evolutionary analysis

[责任编辑 刘洋 杨浦]

附表 I 供试材料与来源  
Attached tab. I Materials and sources

材料名称	NCBI 收录号	材料名称	NCBI 收录号
草棉 <i>G. herbaceum</i> A <sub>1</sub>	U12713	长萼棉 <i>G. longicalyx</i> F <sub>1</sub>	U12722
亚洲棉 <i>G. arboreum</i> A <sub>2</sub>	U12712	陆地棉 <i>G. hirsutum</i> AD <sub>1</sub>	U55340
斯特提棉 <i>G. sturtianum</i> C <sub>1</sub>	U12720	海岛棉 <i>G. barbadense</i> AD <sub>2</sub>	U55339
瑟伯氏棉 <i>G. thurberi</i> D <sub>1</sub>	U12711	毛棉 <i>G. tomentosum</i> AD <sub>3</sub>	U12717
辣根 <i>G. armourianum</i> D <sub>2-1</sub>	U12725	黄褐棉 <i>G. mustelinum</i> AD <sub>4</sub>	U12714
雷蒙德氏棉 <i>G. raimondii</i> D <sub>5</sub>	U12718	达尔文氏棉 <i>G. darwinii</i> AD <sub>5</sub>	U12716
拟似棉 <i>G. gossypioides</i> D <sub>6</sub>	U12724	克氏拟似棉属 <i>Gossypioides kirkii</i>	U56783
司笃克氏棉 <i>G. stocksii</i> E <sub>1</sub>	U56812		



(a)基因组DNA检测结果, M为DL15000 DNA Marker; 1~6为艾克棉、斯蒂芬斯棉、异常棉、戴维逊氏棉、克劳茨基棉、旱地棉; (b) ITS片段胶回收产物检测结果, M为DL2000 DNA Marker; (c) AD<sub>6</sub>和AD<sub>7</sub>连接转化克隆菌落PCR检测结果, M为DL2000 DNA Marker.

附图 I 琼脂糖凝胶电泳检测结果  
Attached fig. I Results of agarose gel electrophoresis